

SCREENING DAN KARAKTERISASI PEKTINESTERASE SEBAGAI ENZIM POTENSIAL DALAM KLARIFIKASI SARI BUAH JERUK KEPROK GARUT (*Citrus nobilis* var. *chrysocarpa*)

Screening and Characterization of Pectinesterase as A Potential Enzyme in Keprok Garut Citrus Juice (*Citrus nobilis* var. *chrysocarpa*) Clarification

Rohula Utami, Esti Widowati, Arifah Rahayu

Program Studi Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Pertanian, Universitas Sebelas Maret,
Jl. Ir. Sutami 36 A, Kentingan, Surakarta 57126
Email : rohula_utami@yahoo.com

ABSTRAK

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk melakukan *screening* bakteri penghasil enzim pektinesterase (PE) yang berpotensi dalam proses klarifikasi sari buah jeruk keprok garut (*Citrus nobilis* var. *microcarpa*) serta mengetahui karakteristik enzim pektinesterase yang dihasilkan (pH optimum, suhu optimum, kestabilan pH dan suhu, serta nilai K_M dan V_{maks}). Hasil *screening* didapatkan isolat AR 2, AR 4, AR 6, dan KK 2 sebagai isolat penghasil enzim pektinesterase yang berpotensi dalam proses klarifikasi sari buah jeruk keprok garut. Aktivitas enzim pektinesterase isolat AR 2, AR 4, AR 6 dan KK 2 berturut-turut optimum pada pH 8; pH 7,5; pH 8,5; dan pH 6,5, serta stabil pada pH 4-9, pH 4-9, pH 6-9, dan pH 3-8. Suhu optimum enzim pektinesterase isolat AR 2, AR 4, AR 6, dan KK 2 berturut-turut adalah 55°C, 60°C, 55°C, dan 60°C. Enzim pektinesterase isolat AR 2 stabil pada suhu 30-50°C dan inaktif pada suhu 80°C, enzim pektinesterase isolat AR 4 dan KK 2 stabil pada suhu 30-60°C dan inaktif pada suhu 90°C, sedangkan enzim pektinesterase isolat AR 6 stabil pada suhu 30-60°C namun belum inaktif pada suhu 90°C. Nilai konstanta Michaelis-Menten (K_M) enzim pektinesterase isolat AR 2, AR 4, AR 6, dan KK 2 berturut-turut adalah 0,604; 0,338; 0,971; dan 0,392 mg/ml. Sedangkan nilai kecepatan maksimum (V_{maks}) enzim pektinesterase isolat AR 2, AR 4, AR 6, dan KK 2 berturut-turut adalah 1,218; 0,826; 0,969; dan 1,080 U/ml. Enzim pektinesterase isolat KK 2 memiliki karakteristik yang paling sesuai untuk aplikasi dalam klarifikasi sari buah jeruk keprok garut dibandingkan dengan enzim pektinesterase isolat lainnya.

Kata kunci: Enzim, klarifikasi, pektin, pektinesterase, jeruk keprok garut

ABSTRACT

The objective of this research was screening of pectinesterase (PE) producing bacteria which are potential in clarification of keprok garut citrus juice (*Citrus nobilis* var. *microcarpa*) and characterization of the resulted pectinesterase (optimum pH and temperature, pH and thermal stability, K_M and V_{maks}). The screening result showed that enzyme of isolates AR 2, AR 4, AR 6, and KK 2 was found to be a potential enzyme for clarification of keprok garut citrus juice. Enzyme pectinesterase of isolates AR 2, AR 4, AR 6, and KK 2 had optimum pH at 8; 7.5; 8.5; and 6.5 and stable at pH 4-9, 4-9, 6-9, and 3-8. The optimum temperature enzyme of isolates AR 2 and AR 6 were 55°C and that of AR 4 and KK 2 were 60°C. Enzyme of isolate AR 2 was stable at 30-50°C and inactive at 80°C, AR 4 and KK 2 were stable at 30-60°C and inactive at 90°C whereas AR6 was stable at 30-60°C and still wasn't inactive at 90°C. K_M value of isolates AR 2, AR 4, AR 6, and KK 2 were 0.604; 0.338; 0.971; and 0.392 mg/ml. V_{maks} value of isolates AR 2, AR 4, AR 6, and KK 2 were 1.218; 0.826; 0.969; and 1.080 u/ml. Pectinesterase enzyme of isolates KK 2 was found to be the most potential enzyme for clarification of keprok garut citrus juice.

Keywords: Clarification, enzyme, keprok garut citrus, pectin, pectinesterase

PENDAHULUAN

Jeruk keprok garut (*Citrus nobilis* var. *chrysocarpa*) merupakan jeruk lokal Indonesia yang berdasarkan Keputusan Menteri Pertanian No: 760/KPTS.240/6/99 telah ditetapkan sebagai Jeruk Varietas Unggul Nasional. Data produksi jeruk keprok di kabupaten Garut mengalami peningkatan dari 117.146 Kw pada tahun 2011 menjadi 144.553 Kw pada tahun 2012 (BPS Kabupaten Garut, 2014). Jeruk keprok garut berkulit buah tipis, kasar, mudah terlepas dan mudah patah sehingga menyebabkan kesulitan pasca panen (Soelarso, 1996). Sebagian besar buah jeruk juga diperdagangkan dan dikonsumsi dalam bentuk segar sehingga pada bulan puncak panen menyebabkan kesulitan dalam penyimpanan (Hanif dan Zamzami, 2012). Oleh karena itu, diperlukan proses pengolahan jeruk keprok garut untuk mengoptimalkan potensi, memperpanjang umur simpan, dan meningkatkan nilai ekonominya.

Salah satu bentuk pengolahan buah yang menjadi tren produk minuman adalah sari buah. Namun, sari buah jeruk cenderung semakin keruh dan kental selama penyimpanan yang disebabkan oleh polisakarida seperti pektin, pati, dan komponen hemiselulosa (Sharma dan Chand, 2012). Sari buah yang keruh merupakan suspensi koloid dari pektin, polisakarida netral yang larut dalam asam, gula (fruktosa, glukosa dan sukrosa), protein, lipid dan mineral. Suspensi tersebut sebagian besar berasal dari jaringan buah yang hancur selama pemrosesan buah (Benitez dan Lozano, 2006). Pektin juga dapat menghambat filtrasi sari buah karena membentuk lapisan gel yang sangat kental (Rai dkk., 2006). Pembentukan gel terjadi akibat adanya ikatan hidrogen antara grup karboksil bebas pada molekul pektin dan antara grup hidroksil molekul lain (Raj dkk., 2012). Pektin dan hemiselulosa juga dapat mengikat komponen fenolik dan protein selama proses dan penyimpanan yang menghasilkan pembentukan senyawa kompleks yang *irreversible* sehingga menyulitkan klarifikasi (Minh, 2014). Oleh karena itu, pada proses industri biasanya dilakukan proses depektinasi menggunakan enzim untuk menghilangkan pektin yang ada dalam sari buah.

Pektinesterase atau Pektin Metil Esterase (PME) atau pektin metoksilase atau pektin dimetoksilase (kode : EC 3.1.1.11) merupakan salah satu enzim pektinase yang biasa digunakan untuk proses depektinasi dalam industri sari buah. Menurut Basak dan Ramaswamy (2001) pektinesterase merupakan enzim yang berpengaruh dalam klarifikasi sari buah jeruk. Pektinesterase mengkatalisis hidrolisis pektin yang ada dalam sari buah jeruk menjadi asam pektat dan methanol. Ikatan silang asam pektat dan ion kalsium meningkatkan berat molekul pektin, mengurangi kelarutan pektin sehingga terjadi flokulasi yang menyebabkan hilangnya kekeruhan pada sari

buah dan terjadi klarifikasi spontan (Ingallinera dkk., 2005).

Untuk aplikasi industri, enzim harus stabil dalam kondisi proses. Mikroorganisme termofilik diyakini sebagai alternatif sumber potensial yang baik dari enzim termostabil. Menurut Egas dkk., (1998) enzim dari bakteri termofilik sering memiliki aktivitas katalitik dan stabilitas yang lebih tinggi daripada enzim dari mikroorganisme mesofilik. Penggunaan suhu yang lebih tinggi dalam proses industri dapat mengurangi risiko kontaminasi yang disebabkan oleh mikroorganisme mesofilik (Gaur dkk., 2012). Keuntungan penggunaan enzim termostabil adalah menurunkan jumlah enzim yang dibutuhkan dalam reaksi karena semakin meningkat suhu proses maka tingkat kecepatan reaksi juga meningkat (Zamost dkk., 1991).

Produksi enzim menggunakan mikroba memiliki kelebihan yaitu mikroorganisme dapat berkembang biak dengan cepat, pertumbuhan relatif mudah diatur, enzim yang dihasilkan tinggi sehingga menurunkan biaya produksi dan enzim lebih stabil (Yusak, 2004). Di samping itu, proses produksi tidak dipengaruhi oleh faktor iklim maupun cuaca dan dapat dilakukan manipulasi genetik serta pengaturan lingkungan untuk meningkatkan hasil (Bharwaj dan Garg, 2010). Mikroorganisme yang telah diketahui dapat memproduksi enzim pektinesterase antara lain *Phytophthora infestans* (Forster, 1988), *Erwinia chrysanthemi* B341 (Pitkanen dkk., 1992), *Saccharomyces cerevisiae* (Gainvors dkk., 1994), *Lachnospira pectinoschiza* (Cornick dkk., 1994), *Pseudomonas solanacearum* (Schell dkk., 1994), *Aspergillus niger* (Maldonado dkk., 1994; Maldonado dan Saad, 1998), *Lactobacillus lactis* subsp. *Cremoris* (Karan dan Belarbi, 1995), *Penicillium frequentans* (Kawato dkk., 1999), *E. chrysanthemi* 3604 (Laurent dkk., 2000), *Penicillium occitanis* (Hadj-Taieb dkk., 2002), *A. japonicus* (Semenova dkk., 2003) dan *Fusarium asiaticum* (Glinka dan Liao, 2011). Jayani dkk. (2005) menyampaikan bahwa sejumlah PE mempunyai berat molekul berkisar antara 35–50 kDa, aktif pada pH antara pH 4,0 – 8,0 dan optimum pada suhu 40–50°C. Pada penelitian Schink dan Zeikus (1983), enzim pektinesterase yang dihasilkan oleh bakteri termofilik *Clostridium thermosulfurogenes* menunjukkan aktivitas stabil dan aktif pada suhu tinggi yaitu $\geq 60^\circ\text{C}$.

Penelitian *screening* isolat bakteri termofilik penghasil enzim pektinesterase yang bersumber dari limbah sayuran dan limbah kulit jeruk keprok garut ini diharapkan mampu menghasilkan enzim yang berpotensi dalam proses klarifikasi sari buah jeruk keprok garut. Penelitian ini juga bertujuan untuk mengetahui karakteristik enzim pektinesterase yang dihasilkan oleh isolat bakteri termofilik. Aplikasi enzim pektinesterase pada sari buah jeruk keprok garut diharapkan dapat mengurangi kekeruhan dan menurunkan viskositas sari

buah jeruk, sehingga dapat memberikan peluang pemanfaatan jeruk keprok garut sebagai bahan baku pembuatan minuman sari buah jernih, terutama pada skala industri.

METODE PENELITIAN

Bahan

Isolat bakteri yang digunakan dalam penelitian ini didapatkan dari Laboratorium Rekayasa Proses Pengolahan Pangan dan Hasil Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Sebelas Maret, yaitu isolat AR 1, AR 2, AR 3, AR 4, AR 5, AR 6, AR 7, AR 8, dan AR 9 (isolasi dari limbah sayuran) dan isolat KK 1, KK 2, KK 3, KK 4, dan KK 5 (isolasi dari limbah kulit jeruk keprok garut). Semua isolat merupakan bakteri Gram negatif (kecuali AR 5), endospora negatif, dan katalase positif dengan bentuk bulat atau batang. Klarifikasi sari buah jeruk menggunakan buah jeruk keprok garut yang diperoleh di pasar Gedhe Surakarta. Bahan analisis penelitian antara lain menggunakan *yeast extract*, Natrium Hidroksida (NaOH), Natrium Hidrogen Fosfat (Na_2HPO_4), Kalium Dihidrogen Fosfat (KH_2PO_4), Magnesium Sulfat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), Kalium Klorida (KCl), *bacteriological agar*, Ammonium Sulfat ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), *buffer* asetat, *buffer* fosfat dan *buffer* Karbonat-bikarbonat dari MERCK serta *pectin citrus* dari SIGMA.

Tahap I. Screening Isolat Penghasil Enzim Pektinesterase yang Berpotensi dalam Proses Klarifikasi Sari Buah Jeruk Keprok Garut

Screening isolat uji dilakukan berdasarkan pada aktivitas enzim sebagai parameter utama dan jumlah bakteri sebagai parameter pendukung. Pengujian aktivitas enzim dilakukan terhadap enzim kasar yang dihasilkan dengan menggunakan metode *Kertes*. Penentuan jumlah bakteri dilakukan dengan pengukuran turbiditas media kultur yang dinyatakan sebagai *Optical Density* (OD) menggunakan spektrofotometer UV-Vis (*Shimadzu*) pada panjang gelombang 400 nm. Selain itu, pengujian kemampuan klarifikasi dari enzim pada sari buah jeruk keprok garut serta pengujian aktivitas depolimerisasi dari enzim pada pektin cair 1% juga dilakukan untuk mengetahui potensi enzim dalam proses klarifikasi sari buah.

Produksi enzim kasar. Enzim kasar diproduksi dengan cara inokulasi setiap isolat bakteri sebanyak 10% pada media pektin sitrus cair (*yeast ekstrak* 1g/L; Na_2HPO_4 0,9 g/L; KH_2PO_4 1g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g/L; KCl 0,2 g/L; dan pektin sitrus 1g/L) dan inkubasi pada suhu 55°C selama 24 jam dengan agitasi 144 rpm. Enzim kasar diperoleh dengan cara sentrifugasi cairan hasil fermentasi pada kecepatan 6000 rpm pada 4°C selama 15 menit dan supernatan yang didapatkan merupakan enzim kasar (Widowati dkk., 2014)

dan selanjutnya dilakukan pengujian aktivitas enzim sesuai metode titrasi *Kertes*.

Pengujian aktivitas enzim pektinesterase. Prosedur analisis aktivitas enzim pektinesterase dikerjakan dengan metode titrasi *Kertes* yang dijelaskan dalam Dixit dkk. (2013) pada suhu 30°C dan pH 7. Larutan substrat enzim merupakan *citrus pectin* (SIGMA) 1% dalam 0,1 M NaCl (MERCK) (pH 7). Sebanyak 5 ml larutan substrat pektin dan 0,2 ml isolat enzim pektinesterase dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan pH diatur kembali pada pH 7. Campuran diinkubasi pada suhu 30°C dalam *circulating bath* (HAAKE DL 30) selama 30 menit. Setelah itu dilakukan pengukuran pH akhir, kemudian pH akhir dikembalikan ke pH awal dengan penambahan NaOH (MERCK) 0,01 N. Volume NaOH 0,01 N yang ditambahkan digunakan untuk penentuan aktivitas enzim. Larutan substrat tanpa penambahan enzim digunakan sebagai kontrol. Satu unit enzim didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dapat membebaskan 1 μmol gugus karboksil bebas per ml per menit pada kondisi uji.

Pengujian kemampuan klarifikasi. Sari buah jeruk keprok garut dipersiapkan untuk pengujian kemampuan enzim pektinesterase dalam klarifikasi. Buah jeruk keprok garut dicuci, dibelah menjadi dua bagian kemudian diperas menggunakan pemeras *hand juicer*. Sari buah jeruk disaring untuk menghilangkan *pulp* dan padatan yang ada di dalam sari buah jeruk. Sebanyak 20 ml sari buah jeruk ditambahkan 2 ml enzim pektinesterase dan diinkubasi pada suhu 50°C selama 1 jam (Teixeira dkk., 2011). Sari buah jeruk tanpa penambahan enzim digunakan sebagai kontrol. Setelah inkubasi dilakukan pengujian viskositas dengan viskometer Oswald (Karangwa dkk., 2010), total padatan terlarut (TPT) menggunakan *hand refractometer* (ATAGO) dan transmitansi larutan dengan spektrofotometer UV-Vis (*Shimadzu*) pada panjang gelombang 600 nm (Karangwa dkk., 2010).

Pengujian aktivitas depolimerisasi. Aktivitas depolimerisasi diketahui dengan melakukan pengujian enzim dalam pektin cair 1% (Annisa dan Girish, 2014). Enzim pektinesterase sebanyak 0,2 ml ditambahkan ke dalam 10 ml pektin cair 1%. Larutan pektin cair 1% tanpa penambahan enzim digunakan sebagai kontrol. Larutan diinkubasi pada suhu 50°C selama 1 jam kemudian dilakukan pengujian viskositas dengan viskometer Oswald dan transmitansi larutan dengan spektrofotometer UV-Vis (*Shimadzu*) pada panjang gelombang 600 nm.

Tahap II. Produksi dan Pemurnian Parsial Enzim Pektinesterase

Produksi enzim. Stok inokulum isolat terpilih sebanyak 10% dipindahkan ke dalam media pektin cair steril

dan diinkubasi pada suhu 55°C dengan agitasi 144 rpm. Pemanenan enzim dilakukan pada waktu optimum produksi enzim pektinesterase berdasarkan kurva pertumbuhan dari masing-masing isolat. Enzim kasar didapatkan dengan sentrifugasi suspensi sel dalam media pektin cair dengan kecepatan 6000 rpm suhu 4°C selama 15 menit sehingga akan didapatkan supernatan yang merupakan enzim pektinesterase kasar. Enzim kasar tersebut kemudian dimurnikan secara parsial melalui presipitasi ammonium sulfat dan dialisis (Widowati dkk., 2014).

Pemurnian parsial. Pemurnian enzim secara parsial dilakukan dengan presipitasi ammonium sulfat ((NH₄)₂SO₄) (MERCK) dan dialisis (Janani dkk., 2011). Untuk mengetahui persentase kejenuhan ammonium sulfat terbaik maka dilakukan optimasi pada kejenuhan ammonium sulfat 50%, 60%, 70%, dan 80%. Jumlah ammonium sulfat yang ditambahkan untuk mendapatkan kejenuhan tersebut ditentukan menggunakan tabel kejenuhan ammonium sulfat. Persentase kejenuhan ammonium sulfat dengan aktivitas enzim pektinesterase tertinggi dipilih untuk pengendapan skala besar.

Penambahan ammonium sulfat ke dalam ekstrak enzim kasar dilakukan sedikit demi sedikit sambil diaduk dengan *magnetic stirrer* dan dibiarkan selama satu malam pada suhu 4°C. Selanjutnya disentrifugasi 3500 rpm, suhu 4°C, selama 15 menit. Pelet yang diperoleh diresuspensikan dengan 10 ml 50 mM *buffer* fosfat (MERCK) pH 7 kemudian dimasukkan ke dalam kantong dialisis *cut off* 12 kDa kemudian direndam dalam gelas kimia yang berisi *buffer* fosfat 50 mM (pH 7,0) selama 24 jam suhu 4°C sambil diaduk dengan *magnetic stirrer*. Penggantian *buffer* fosfat dilakukan sebanyak 3 kali setiap 8 jam sekali dan dicek kandungan ammonium sulfat dalam larutan dengan meneteskan BaCl₂. Amonium sulfat akan bereaksi dengan BaCl₂ menghasilkan endapan putih BaSO₄. Dialisis dihentikan ketika penambahan BaCl₂ tidak terbentuk lagi endapan putih. Setelah didapatkan enzim pektinesterase murni parsial kemudian dilakukan karakterisasi enzim pektinesterase meliputi pengujian pH optimum, suhu optimum, kestabilan pH dan suhu, serta kinetika enzim berupa K_M dan V_{maks}.

Protein enzim (mg protein/ml enzim) dianalisis secara spektrofotometri dengan metode Lowry (Sudarmadji dkk., 2010). Absorbansi dilakukan pada panjang gelombang 600 nm dengan spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu). *Bovine Serum Albumin* (BSA) digunakan sebagai standar protein.

Tahap III. Karakterisasi Enzim Pektinesterase

Penentuan pH dan suhu optimum enzim pektinesterase. Pengujian pH optimum enzim dilakukan pada *range* pH 5,0-9,0 dengan interval pH 0,5 (Frittrang dkk.,

1992). Sebanyak 0,2 ml enzim pektinesterase yang telah didialisis dimasukkan ke dalam 10 ml larutan substrat pektin 1% dalam NaCl 0,1 M yang telah diatur pH-nya. Larutan diinkubasi pada suhu 30°C selama 30 menit kemudian reaksi dihentikan dengan menginkubasi larutan kontrol dan sampel pada suhu 100°C selama 10 menit selanjutnya dilakukan pengujian aktivitas enzim menggunakan metode Kertesz.

Suhu optimum enzim diuji pada *range* suhu 30°C-60°C dengan interval suhu 5°C pada pH 7 (Dixit dkk., 2013). Larutan substrat pektin 1% dalam NaCl 0,1 M (pH 7) sebanyak 10 ml diinkubasi pada suhu uji. Setelah suhu larutan substrat mencapai suhu uji, sebanyak 0,2 ml enzim pektinesterase yang telah didialisis dimasukkan ke dalam larutan dan diinkubasi selama 30 menit kemudian diuji aktivitas enzim pektinesterase menggunakan metode Kertesz. Larutan substrat pektin 1% tanpa penambahan enzim sebagai kontrol.

Penentuan kestabilan pH dan suhu enzim pektinesterase. Uji kestabilan pH enzim pektinesterase dilakukan pada pH 3-9 pada suhu optimum enzim (Hou dkk., 1997). Sebanyak 0,2 ml enzim pektinesterase dimasukkan ke dalam 0,2 ml *buffer* yang telah diatur suhunya. Inkubasi dilakukan selama 30 menit. Setelah didinginkan secara cepat, enzim pektinesterase dalam *buffer* diuji menggunakan metode titrasi Kertesz. *Buffer* yang digunakan untuk uji adalah 10 mM *buffer* sitrat (MERCK) pH 3, 4, 5, dan 6, 10 mM *buffer* fosfat (MERCK) pH 7 dan 8, serta 10 mM *buffer* Karbonat-bikarbonat (MERCK) pH 9.

Kestabilan suhu enzim pektinesterase diuji pada suhu 30-90°C pada pH optimum (Saenz dkk., 2000). Sebanyak 0,2 ml *buffer* sesuai pH optimum enzim dalam tabung reaksi diinkubasi dalam *circulating bath* (HAAKE DL 30) untuk mengatur suhu *buffer* mencapai suhu uji kemudian 0,2 ml enzim pektinesterase ditambahkan ke dalam *buffer*. Inkubasi dilakukan selama 30 menit kemudian larutan didinginkan secara cepat dan dilakukan pengujian aktivitas enzim sesuai metode titrasi Kertesz.

Penentuan kinetika enzim nilai K_M dan V_{maks} PE. Larutan substrat pektin sitrus (SIGMA) dibuat dengan konsentrasi antara 0,25 – 10 mg/ml dalam larutan NaCl (MERCK) 0,1 M (pH 7,0), lalu dilakukan pengujian aktivitas enzim sesuai prosedurnya (Maria dkk., 2007). Setelah itu ditentukan aktivitas enzim pektinesterase (u/ml) pada masing-masing konsentrasi substrat. Nilai K_M dan V_{maks} ditentukan berdasarkan persamaan kurva *Lineweaver-Burk*.

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{maks}} + \frac{K_M}{V_{maks}} \left(\frac{1}{[S]} \right) \quad (1)$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Screening Isolat Penghasil Enzim Pektinesterase Potensial untuk Klarifikasi Sari Buah Jeruk Keprok Garut

Hasil pengujian menunjukkan bahwa keempat belas isolat mampu menghasilkan enzim pektinesterase. Seleksi isolat dilakukan untuk mendapatkan isolat terbaik yang dapat digunakan untuk memproduksi enzim pektinesterase dan diaplikasikan pada klarifikasi sari buah jeruk. Data aktivitas enzim pektinesterase (u/ml), jumlah sel akhir (sel/ml), dan kemampuan enzim dalam klarifikasi sari buah jeruk keprok garut dan pektin cair 1 %. ditampilkan dalam Tabel 1.

Aktivitas enzim pektinesterase (u/ml) dan jumlah sel akhir (sel/ml). Aktivitas enzim pektinesterase merupakan parameter utama dalam seleksi isolat uji karena enzim yang digunakan dalam tahap ini merupakan ekstrak enzim kasar yang kemungkinan tidak hanya mengandung enzim pektinesterase saja namun dapat mengandung enzim lain yang juga dapat berperan dalam klarifikasi sari buah jeruk. Aktivitas enzim pektinesterase dari isolat bervariasi antara 0,0100 – 0,0450 u/ml. Dari empat belas isolat, hasil pengujian menunjukkan bahwa isolat AR 6 mempunyai aktivitas enzim pektinesterase tertinggi (0,0450 u/ml) dan diikuti oleh isolat AR 4 (0,0283 u/ml), dan KK 2 (0,0267 u/ml). Penelitian lainnya juga melaporkan bahwa meskipun ditemukan 26 isolat *Aspergillus niger* yang diisolasi dari kulit

jeruk mempunyai aktivitas pektinase namun hanya 6 isolat yang menunjukkan aktivitas yang tinggi (Truc dkk., 2011). Isolat AR 6 juga diketahui memiliki jumlah sel tertinggi, yaitu sebanyak $3,22.10^7$ sel/ml.

Kemampuan klarifikasi. Aplikasi enzim kasar ke dalam sari buah jeruk keprok garut dilakukan untuk mengetahui kemampuan enzim dalam klarifikasi sari buah jeruk. Menurut Ceci dan Lozano (2010), pektin yang larut dalam sari buah membuat sari buah sangat kental sehingga menghambat proses penyaringan. Penambahan enzim pektinase ke dalam sari buah jeruk akan menyebabkan penurunan viskositas sari buah jeruk. Hasil pengukuran viskositas sari buah jeruk menunjukkan bahwa sari buah jeruk yang diberi enzim kasar mengalami penurunan viskositas jika dibandingkan dengan kontrol kecuali untuk sari buah jeruk yang diberi perlakuan enzim kasar isolat KK 4, KK 2, AR 6, dan AR 5. Viskositas sari buah jeruk dengan perlakuan enzim bervariasi dari 0,898 – 1,210 cp. Penurunan viskositas juga terjadi setelah perlakuan enzim pektinase kasar dari *A. japonicus* 586 pada sari buah cupuacu dari Brazil (Teixeira dkk., 2011), serta enzim pektinolitik komersial pada sari buah lemon (Ucan dkk., 2014).

Semakin tinggi nilai transmitansi maka sari buah jeruk semakin jernih. Hasil pengujian transmitansi menunjukkan bahwa nilai transmitansi sari buah jeruk yang diberi enzim kasar lebih tinggi dibandingkan dengan sari buah jeruk

Tabel 1. Aktivitas enzim pektinesterase (u/ml), jumlah sel akhir (sel/ml), dan kemampuan enzim dalam klarifikasi sari buah jeruk keprok Garut dan pektin cair 1 % pada masing-masing isolat

Kode isolat	Aktivitas enzim (u/ml)	Jumlah sel akhir (sel/ml)	Sari buah jeruk			Pektin cair 1%	
			Viskositas (cp)	%T	TPT (°Brix)	Viskositas (cp)	%T
AR 1	0,0133	$2,98.10^7$	0,938	2,60	8,00	1,230	83,10
AR 2	0,0233	$1,35.10^7$	0,912	2,90	8,00	1,120	83,80
AR 3	0,0117	$1,37.10^7$	0,896	2,60	8,00	1,170	83,80
AR 4	0,0283	$1,64.10^7$	0,930	2,70	8,00	1,200	83,20
AR 5	0,0167	$6,90.10^5$	1,210	2,90	8,00	1,210	83,00
AR 6	0,0450	$3,22.10^7$	1,080	2,80	8,00	1,180	83,00
AR 7	0,0217	$2,86.10^7$	0,923	2,50	8,00	1,220	83,40
AR 8	0,0150	$1,89.10^7$	0,905	2,60	8,00	1,220	83,40
AR 9	0,0250	$1,97.10^7$	0,925	2,40	8,00	1,170	83,80
KK 1	0,0217	$1,55.10^7$	0,904	2,50	8,00	1,200	83,40
KK 2	0,0267	$1,38.10^7$	0,951	2,50	8,00	1,200	83,20
KK 3	0,0100	$1,86.10^7$	0,917	2,40	8,00	1,460	83,30
KK 4	0,0167	$1,11.10^7$	0,947	2,70	8,00	1,220	83,30
KK 5	0,0217	$5,45.10^6$	0,900	2,50	8,00	1,170	83,00
Kontrol			0,946	1,90	9,00	1,200	82,90

kontrol. Nilai transmitansi sari buah jeruk dengan perlakuan enzim bervariasi dari 2,40-2,90% dan penambahan enzim kasar isolat AR 2 memiliki nilai transmitansi paling tinggi (2,90%)

Hasil pengukuran nilai TPT pada sari buah jeruk yang diberi perlakuan enzim, yaitu 8° Brix dan pada sari buah jeruk kontrol sebesar 9° Brix. Semakin tinggi kadar sukrosa maka nilai °Brix semakin meningkat. Penurunan nilai total padatan terlarut juga terjadi pada penelitian Iriani dkk. (2005), sari buah mangga kuini yang diberi penambahan pektinase mengalami penurunan total padatan terlarut selama penyimpanan. Aktivitas enzim mendegradasi pektin menjadi senyawa sederhana sehingga mengakibatkan penurunan total padatan terlarut.

Aktivitas depolimerisasi. Untuk membandingkan kemampuan enzim dalam depolimerisasi pektin dalam sari buah jeruk dengan pektin sintetis, maka dilakukan aplikasi enzim kasar ke dalam pektin cair 1% dan dilakukan pengamatan pengaruh penambahan enzim kasar terhadap penurunan viskositas pektin cair 1% dan % transmitansi. Menurut Saranraj dan Naidu (2014) enzim pektinase merupakan enzim yang mendepolimerisasi pektin melalui reaksi hidrolisis dan transeliminasi dan juga dengan reaksi deesterifikasi, yang menghidrolisis ikatan ester antara gugus karboksil dan gugus metil pektin. Enzim kasar isolat AR 2 merupakan enzim yang menurunkan viskositas pektin cair 1% paling rendah, yaitu sebesar 1,120 cp. Nilai transmitansi pektin cair 1% dengan perlakuan enzim berkisar antara 83-83,8%. Pektin cair 1% dengan penambahan enzim kasar isolat AR 2 memiliki nilai transmitansi paling tinggi (83,8%).

Berdasarkan hasil penelitian maka dipilih empat isolat uji untuk digunakan pada tahapan penelitian berikutnya yaitu isolat AR 2, AR 4, AR 6, dan KK 2. Isolat AR 4, AR 6, dan KK 2 dipilih karena merupakan tiga isolat bakteri dengan aktivitas enzim yang relatif paling tinggi. Isolat AR 6 juga memiliki jumlah sel per ml terbanyak dan nilai transmitansi pada sari buah jeruk keprok garut tertinggi kedua. Isolat AR 2 dipilih karena memiliki nilai transmitansi tertinggi baik pada sari buah jeruk keprok garut maupun pektin cair 1% dan kemampuan enzim dalam menurunkan viskositas pada pektin cair 1%.

Pemurnian Parsial Enzim Pektinesterase Isolat AR 2, AR 4, AR 6, dan KK 2

Hasil optimasi presipitasi enzim kasar dengan garam amonium sulfat pada konsentrasi kejenuhan amonium sulfat 50%, 60%, 70%, dan 80% menunjukkan bahwa aktivitas tertinggi enzim pektinesterase isolat yang satu dengan yang lainnya berada pada fase kejenuhan amonium sulfat yang berbeda-beda. Aktivitas enzim pektinesterase isolat AR 2,

AR 4, AR 6, dan KK 2 tertinggi masing-masing ditemukan pada fraksi kejenuhan 80%; 70%; 50%; dan 60% (Tabel 2). Joshi dkk. (2011) melaporkan bahwa PME yang dihasilkan oleh *Aspergillus niger* menunjukkan aktivitas enzim tertinggi pada fase kejenuhan ammonium sulfat 80%. PME dari *Cladosporium cladosporioides* mempunyai aktivitas enzim tertinggi pada fase kejenuhan ammonium sulfat 60% (Bastos dkk., 2013).

Tabel 2. Pengaruh berbagai konsentrasi ammonium sulfat dalam pemurnian parsial enzim pektinesterase isolat AR 2, AR 4, AR 6, dan KK 2

Kode isolat	Konsentrasi ammonium sulfat (%)	Aktivitas enzim (u/ml)
AR2	50%	0,0783
	60%	0,1100
	70%	0,1100
	80%	0,1200
AR4	50%	0,0500
	60%	0,0400
	70%	0,0717
	80%	0,0200
AR6	50%	0,1133
	60%	0,0867
	70%	0,1000
	80%	0,1100
KK2	50%	0,0433
	60%	0,0933
	70%	0,0783
	80%	0,0867

Pemurnian secara dialisis dilakukan menggunakan membran selofan. Membran selofan yang digunakan adalah membran selofan dengan *cut off* 12 kDa sehingga dapat memisahkan protein dengan partikel non-protein dengan berat molekul lebih kecil dari 12 kDa. Protein yang merupakan enzim akan tertahan di dalam membran sedangkan partikel lain yang memiliki berat molekul lebih kecil dari 12 kDa akan keluar dari membran. Jayani dkk., (2005) menyampaikan bahwa berat molekul sejumlah PE berkisar antara 35–50 kDa. Dialisis juga dilakukan untuk menghilangkan garam ammonium sulfat yang ada dalam ekstrak enzim kasar. Aktivitas enzim pektinesterase pada ekstrak enzim kasar, setelah presipitasi ammonium sulfat, dan setelah dialisis ditampilkan pada Tabel 3. Derajat kemurnian enzim didasarkan pada aktivitas spesifik, yaitu sejumlah unit

enzim (u) per milligram protein. Dari data yang ditampilkan pada Tabel 3 dapat diketahui bahwa pemurnian parsial dapat meningkatkan aktivitas enzim.

Tabel 3. Aktivitas enzim pektinesterase pada tahap-tahap pemurnian

Kode isolat	Tahap pemurnian	Aktivitas enzim (u/ml)	Protein (mg/ml)	Aktivitas spesifik (u/mg)
AR 2	Enzim kasar	0,023	2,156	0,0466
	Presipitasi $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 80%	0,120	0,871	0,4851
	Dialisis	0,400	0,790	1,7279
AR 4	Enzim kasar	0,028	2,108	0,0577
	Presipitasi $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 70%	0,072	0,941	0,2746
	Dialisis	0,350	0,866	1,4210
AR 6	Enzim kasar	0,045	2,118	0,0914
	Presipitasi $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 50%	0,113	0,785	0,4917
	Dialisis	0,333	0,710	1,5442
KK 2	Enzim kasar	0,027	2,054	0,0556
	Presipitasi $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 60%	0,093	0,919	0,3632
	Dialisis	0,317	0,817	1,3388

Ekstrak enzim kasar mempunyai aktivitas enzim yang kecil karena banyak mengandung protein-protein non enzim yang dapat mengganggu aktivitas katalitik enzim. Penambahan ammonium sulfat berpengaruh terhadap protein yang terendapkan selama proses pemurnian sehingga pemurnian enzim dapat meningkat aktivitas enzim. Joshi dkk., (2011) mengemukakan bahwa pemurnian parsial enzim

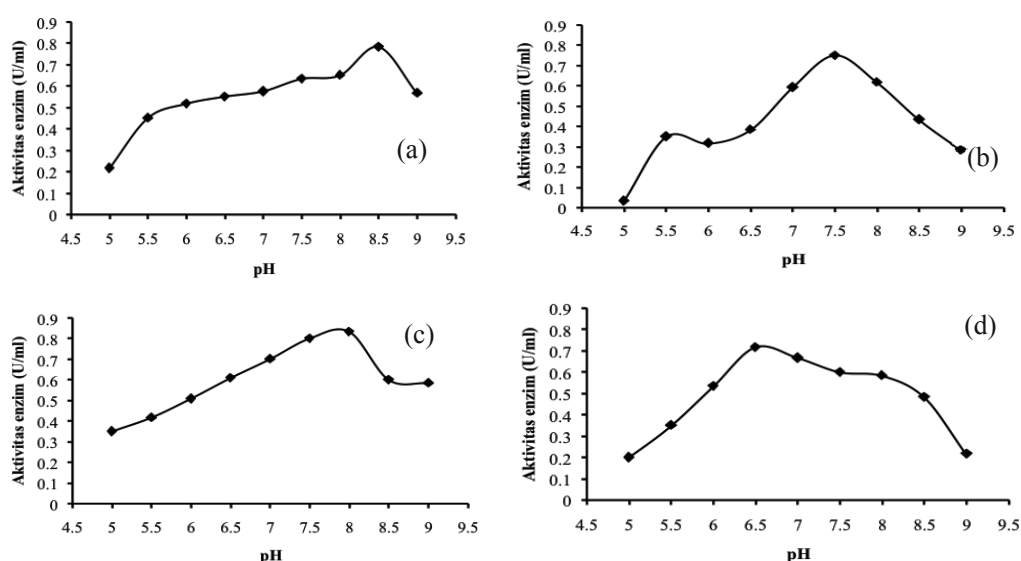
dapat meningkatkan kestabilan enzim. Hal tersebut karena beberapa inhibitor enzim yang mungkin berada dalam ekstrak enzim dapat dihilangkan selama pemurnian.

Karakterisasi Enzim Pektinesterase Isolat AR 2, AR 4, AR 6 dan KK 2

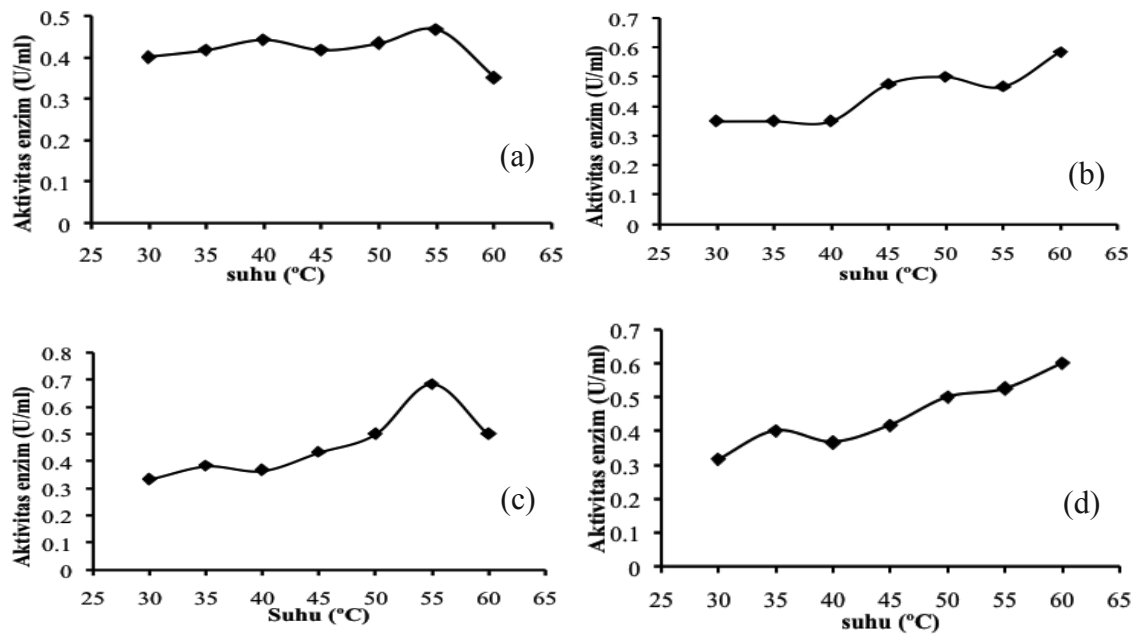
pH dan suhu optimum enzim pektinesterase.

Karakterisasi enzim dilakukan untuk mengetahui kondisi optimal enzim yang dapat digunakan dalam aplikasi enzim di bidang industri. Nilai pH optimum merupakan pH yang dapat menyebabkan kecepatan reaksi enzim paling tinggi. Berdasarkan Gambar 1, pH optimum enzim pektinesterase isolat AR 2, AR 4, AR 6, dan KK 2 berturut-turut adalah 8; 7,5; 8,5; dan pH 6,5. Menurut Winarno (1986), pada enzim yang sama sering mempunyai pH optimum yang berbeda, tergantung dari asal enzim tersebut. Enzim pektinesterase dari bakteri *Clostridium thermosaccharolyticum* optimum pada pH 7 (Rijssel dkk., 1993), *Clostridium thermosulfurogenes* optimum pada pH 6,5 (Schink dan Zeikus, 1983), kapang *Fusarium asiaticum* optimum pada pH 6,5 (Glinka dan Liao, 2011), dan kapang *Phytophthora infestans* optimum pada pH 7 (Forster dan Rasched, 1985).

Suhu optimum merupakan suhu pada saat laju reaksi enzim paling tinggi mengubah substrat dan merupakan hasil kesetimbangan antara laju kenaikan aktivitas dan laju kerusakan enzim (Bintang, 2010). Hasil pengujian suhu optimum dapat dilihat pada Gambar 2. Enzim pektinesterase isolat AR 2 dan isolat AR 6 memiliki suhu optimum 55°C sedangkan enzim pektinesterase isolat AR 4 dan isolat KK 2 memiliki suhu optimum 60°C. Enzim pektinesterase dari sumber isolat yang berbeda juga menunjukkan suhu optimum yang berbeda pula antara lain enzim pektinesterase bakteri



Gambar 1. Grafik pH optimum enzim pektinesterase isolat AR 2 (a), AR 4 (b), AR 6 (c), dan KK 2 (d)

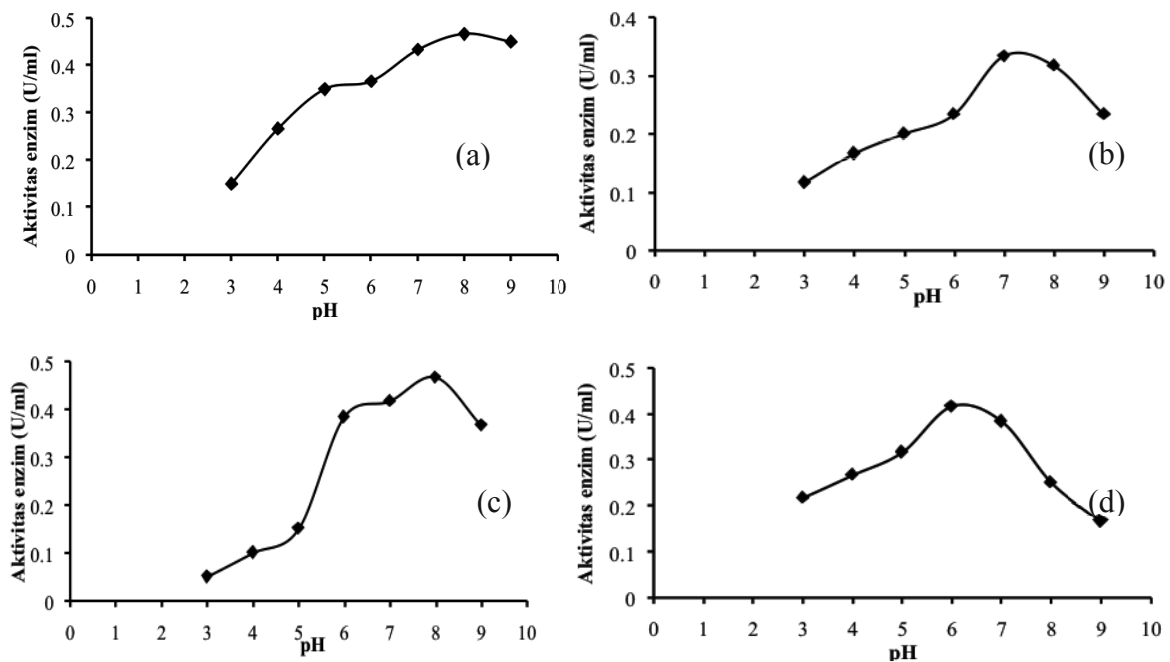


Gambar 2. Grafik suhu optimum enzim pektinesterase isolat AR 2 (a), AR 4 (b), AR 6 (c), dan KK 2 (d)

Clostridium thermosulfurogenes mempunyai suhu optimum pada suhu 70°C (Schink dan Zeikus, 1983) dan kapang *A. niger* strain MTCC 281 mempunyai suhu optimum pada suhu 50°C (Sharma dkk., 2011).

Kestabilan pH dan suhu enzim pektinesterase. Selain pH dan suhu optimum, faktor penting yang menentukan

kualitas enzim dalam aplikasi di bidang industri adalah stabilitas enzim terhadap pH dan suhu. Stabilitas enzim adalah kemampuan enzim untuk menjaga struktur dan konformasinya pada kondisi lingkungan tertentu sehingga aktivitas tetap tinggi. pH rendah atau pH tinggi dapat menyebabkan terjadinya denaturasi yang akan mengakibatkan aktivitas enzim menurun (Poedjiadi, 1994). Pengujian stabilitas pH



Gambar 3. Grafik kestabilan pH enzim pektinesterase isolat AR 2 (a), AR 4 (b), AR 6 (c), dan KK 2 (d)

enzim pektinesterase menggunakan variasi pH *buffer* 3-9. Enzim pektinesterase isolat AR 2 stabil pada pH 4-9, enzim pektinesterase isolat AR 4 stabil pada rentang pH 4-9, aktivitas enzim pektinesterase isolat AR 6 stabil pada pH 6-9, sedangkan enzim pektinesterase isolat KK 2 menunjukkan aktivitas yang stabil pada pH 3-8 (Gambar 3). Pada rentang pH tersebut masing-masing enzim mempunyai aktivitas lebih dari 50% dari nilai aktivitas tertingginya. Meskipun pH optimum enzim pektinesterase isolat AR 2, AR 4, AR 6, dan KK 2 berada pada rentang pH basa, namun hasil pengujian kestabilan pH menunjukkan bahwa enzim pektinesterase AR 2, AR 4, AR 6, dan KK 2 juga stabil pada pH asam. Enzim pektinesterase semua isolat masih menunjukkan aktivitas pada pH 3 walaupun aktivitasnya rendah. Kestabilan enzim pada rentang pH yang luas merupakan kelebihan enzim untuk aplikasi di industri.

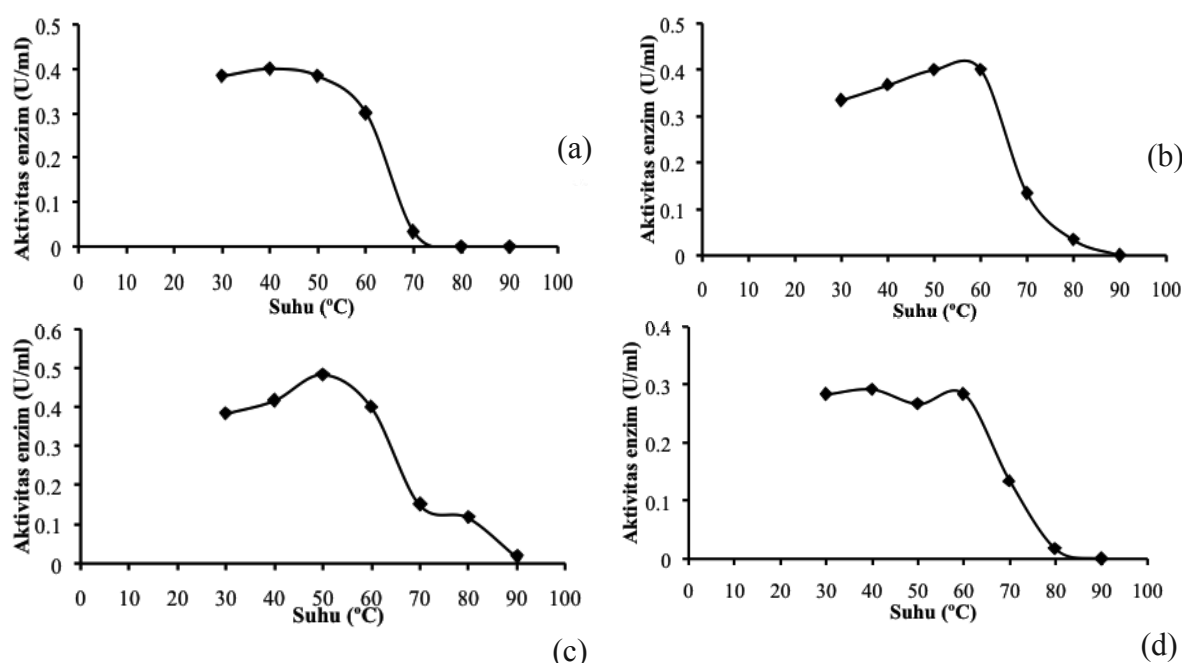
Kestabilan suhu merupakan salah satu karakteristik penting yang harus dimiliki enzim dalam aplikasi di industri. Aktivitas enzim pektinesterase isolat AR 2 stabil pada suhu 30-50°C dan inaktif pada suhu 80°C, enzim pektinesterase isolat AR 4 dan KK 2 stabil pada suhu 30-60°C dan inaktif pada suhu 90°C, sedangkan enzim pektinesterase isolat stabil pada suhu 30-60°C namun belum inaktif pada suhu 90°C. Pada rentang suhu kestabilan tersebut masing-masing enzim mempunyai aktivitas lebih dari 75% dari nilai aktivitas tertingginya, sedangkan pada suhu di luar batas kestabilan enzim mempunyai aktivitas kurang dari 50%. Hasil uji kestabilan suhu enzim pektinesterase isolat AR 2, AR 4, AR 6, dan KK 2 ditampilkan pada Gambar 4.

Kinetika enzim. Kinetika enzim berkaitan dengan kecepatan suatu enzim bekerja. Konstanta *Michaelis Menten* (K_M) merupakan konsentrasi substrat untuk mencapai kecepatan aktivitas enzim setengah maksimum, sedangkan V_{maks} adalah kecepatan aktivitas enzim maksimal. K_M merupakan suatu indikator kekuatan ikatan kompleks ES. Bila K_M besar berarti ikatan kompleks ES lemah dan bila K_M kecil ikatan ES kuat (Winarno, 1986). Nilai K_M yang semakin kecil maka ikatan substrat dengan enzim akan semakin kuat sehingga akan mudah untuk menghasilkan produk. Nilai K_M dan V_{maks} ditentukan melalui persamaan regresi linier grafik *Lineweaver-Burk*. Nilai K_M dan V_{maks} enzim pektinesterase isolat AR 2, AR 4, AR 6, dan KK 2 dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Nilai K_M (mg/ml) dan V_{maks} (U/ml) enzim pektinesterase isolat AR 2, AR 4, AR 6, dan KK 2

Kode Isolat	K_M (mg/ml)	V_{maks} (U/ml)
AR 2	0,604	1,218
AR 4	0,338	0,826
AR 6	0,971	0,969
KK 2	0,392	1,080

Berdasarkan nilai K_M , enzim pektinesterase isolat AR 4 memiliki nilai K_M yang paling rendah yang berarti enzim pektinesterase isolat AR 4 memiliki afinitas yang paling kuat terhadap pektin dibanding enzim pektinesterase isolat lainnya, namun dalam proses klarifikasi sari buah jeruk keprok garut dibutuhkan enzim pektinesterase yang tahan terhadap



Gambar 4. Grafik kestabilan suhu enzim pektinesterase isolat AR 2 (a), AR 4 (b), AR 6 (c), dan KK 2 (d)

kondisi proses baik terhadap suhu maupun pH lingkungan. Menurut Hui dkk. (2006), pH sari buah jeruk berkisar 3,6-4,3 sedangkan suhu klarifikasi sari buah menurut Ceci dan Lozano (2010), berkisar antara 45-50°C. Berdasarkan hasil karakterisasi enzim pektinesterase dari isolat terpilih, enzim pektinesterase isolat KK 2 memiliki karakteristik yang paling mendekati kondisi klarifikasi sari buah jeruk dibandingkan enzim pektinesterase isolat lainnya. Nilai pH optimum enzim pektinesterase isolat KK 2 pada pH 6,5 dan stabil pada pH 3-8. Enzim pektinesterase isolat KK 2 bersifat termostabil karena memiliki suhu optimum pada suhu 60°C dan stabil pada suhu 30-60°C. Enzim pektinesterase isolat KK 2 memiliki nilai K_M sebesar 0,392 (mg/ml) yang merupakan nilai K_M terendah kedua dibandingkan enzim pektinesterase isolat AR 2, AR 4, dan AR 6. Disamping itu, isolat KK 2 memiliki waktu optimum produksi enzim yang cepat, yaitu pada jam ke-7. Waktu pemanenan yang lebih cepat akan menghemat biaya produksi enzim.

KESIMPULAN

Hasil *screening* didapatkan isolat AR 2, AR 4, AR 6, dan KK 2 sebagai isolat penghasil enzim pektinesterase yang berpotensi dalam proses klarifikasi sari buah jeruk keprok garut. Aktivitas enzim pektinesterase isolat AR 2, AR 4, AR 6 dan KK 2 berturut-turut optimum pada pH 8; pH 7,5; pH 8,5; dan pH 6,5 serta stabil pada pH 4-9, pH 4-9, pH 6-9, dan pH 3-8. Suhu optimum enzim pektinesterase isolat AR 2, AR 4, AR 6 dan KK 2 berturut-turut adalah 55°C, 60°C, 55°C, dan 60°C. Enzim pektinesterase isolat AR 2 stabil pada suhu 30-50°C dan inaktif pada suhu 80°C, enzim pektinesterase isolat AR 4 dan KK 2 stabil pada suhu 30-60°C dan inaktif pada suhu 90°C, sedangkan enzim pektinesterase isolat AR 6 stabil pada suhu 30-60°C namun belum inaktif pada suhu 90°C. Nilai konstanta Michaelis-Menten (K_M) enzim pektinesterase isolat AR 2, AR 4, AR 6, dan KK 2 berturut-turut adalah 0,604; 0,338; 0,971; dan 0,392 mg/ml. Sedangkan nilai kecepatan maksimum (V_{maks}) enzim pektinesterase isolat AR 2, AR 4, AR 6, dan KK 2 berturut-turut adalah 1,218; 0,826; 0,969; dan 1,080 U/ml. Enzim pektinesterase isolat KK 2 memiliki karakteristik yang paling sesuai untuk aplikasi dalam klarifikasi sari buah jeruk keprok garut dibandingkan dengan enzim pektinesterase isolat lainnya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada Universitas Sebelas Maret Surakarta yang telah membiayai penelitian ini melalui skim Hibah Riset Insentif Star-Up Dana PNPB UNS dengan nomor kontrak penelitian 858/UN27.11/PN/2014.

DAFTAR PUSTAKA

- Anisa, S.K. dan Girish, K. (2014). Pectinolytic activity of *Rhizopus* sp., and *Trichoderma viride*. *International Journal of Research in Pure and Applied Microbiology* **4**(2): 28-31.
- Badan Pusat Statistik Kabupaten Garut (2014). *Garut dalam Angka 2014*. Badan Pusat Statistik Kabupaten Garut, Garut.
- Basak, S. dan Ramaswamy, H.S. (2001). Pulsed high pressure inactivation of pectin methyl esterase in single strength and concentrated orange juices. *Canadian Biosystem Engineering* **43**: 325-329.
- Bastos, S.C., Pimenta, C.J., Dias, D.R., Chalfoun, S.M., Angelico, C.L. dan Tavares, L.S. (2013). Pectinases from a new strain of *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) De Vries isolated from coffee bean. *World Journal of Agricultural Sciences* **9**(2): 167-172.
- Benitez, E.I dan Lozano, J.E. (2006). Influence of the soluble solids on the zeta potential of a cloudy apple juice. *Latin America Applied Research* **36**: 163-168.
- Bhardwaj, V. dan Garg, N. (2010). Exploitation of micro-organism for isolation and screening of pectinase from environment. *Globelics* **8**: 1-16.
- Bintang, M. (2010). *Biokimia Teknik Penelitian*. PT Gelora Aksara Pratama, Jakarta.
- Ceci, L.N. dan Lozano, J.E. (2010). Use of enzymes for non-citrus juice production. *Enzyme in Fruit and Vegetable Processing- Chemistry and Engineering Application*. Taylor and Francis Group. New York.
- Cornick, N.A., Jensen, N.S., Stahl, D.A., Hartman, P.A. dan Allison, M.J. (1994). *Lachnospira pectinoschiza* sp. nov., an anaerobic pectinophile from the pig intestine. *International Journal of System Bacteriology* **44**: 87-93.
- Dixit, S., Upadhyay, S.K., Singh, H., Pandey, B., Chandrashekar, K. dan Verma, P. C. (2013). Pectin methylesterase of *Datura* species, purification, and characterization from *Datura stramonium* and its application. *Plant Signaling and Behavior* **8**: 1-7.
- Egas, M.C.V., Costa, M.S., Cowan, D.A. dan Pires, E.M.V. (1998). Extracellular α -amylase from *Thermus filiformis* Ork A2: purification and biochemical characterization. *Extremophiles* **2**: 23-32.
- Forster, H. (1988). Pectinesterase from *Phytophthora infestans*. *Methods in Enzymology* **161**: 355-357.
- Forster, H. dan Rasched, I. (1985). Purification and characterization of extracellular pectinesterases from *Phytophthora infestans*. *Plant Physiology* **77**: 109-112.

- Frittrang, A.K., Deising, H. dan Mendgen, K. (1992). Characterization and partial purification of pectinesterase, a differentiation-specific enzyme of *Uromyces viciae-fabae*. *Journal of General Microbiology* **138**: 2213-2218.
- Gainvors, A., Frezier, V., Lemaesquier, H., Lequart, C., Aigle, M. dan Belarbi, A. (1994). Detection of polygalacturonase, pectin lyase and pectinesterase activities in *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Yeast* **10**: 1311-1319.
- Gaur, D., Jain, P.K., Sisodia, Y.S. dan Bajapai, V. (2012). Estimation of extracellular lipolytic enzyme activity by thermophilic *Bacillus sp.* isolated from arid and semi-arid region of Rajasthan, India. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Science* **2**: 619-633.
- Glinka, E.M. dan Liao, Y. (2011). Purification and partial characterisation of pectin methylesterase produced by *Fusarium asiaticum*. *Fungal Biology* **115**(11): 1112-1121.
- Hadj-Taieb, N., Ayadi, M., Trigui, S., Bouabdollah, F. dan Gargouri, A. (2002). Hyperproduction of pectinase activities by fully constitutive mutant (CT 1) of *Penicillium occitanis*. *Enzyme and Microbial Technology* **30**: 662-666.
- Hanif, Z. dan Zamzami, L. (2012). Trend impor jeruk dan posisi Indonesia sebagai produsen jeruk dunia. <http://balitjestro.litbang.deptan.go.id/id/510.html>. [6 Februari 2014].
- Hou, W.N., Jeong, Y., Walker, B.L., Wei, C.I. dan Marshall, M.R. (1997). Isolation and characterization of pectinesterase from valencia orange. *Journal of Food Biochemistry* **21**: 309-333.
- Hui, Y. H., Barta, J., Cano, P., Gusk, T.W., Sidhu, J. S. dan Sinha, N.K. (2006). *Handbook of Fruit and Fruit Processing*. Blackwell Publishing, USA.
- Ingallinera, B., Barbagallo, R.N., Spagna, G., Palmeri, R. dan Todaro, A. (2005). Effects of thermal treatments on pectinesterase activity determined in blood oranges juices. *Enzyme and Microbial Technology* **36**: 258-263.
- Iriani, E.S., Said, E.G., Suryani, A. dan Setyadjit (2005). Pengaruh penambahan konsentrasi pektinase dan kondisi inkubasi terhadap rendemen dan mutu jus mangga kuini (*Mangifera odorata* Griff). *Jurnal Pascapanen* **2**: 11-17.
- Janani, L.K., Kumar, G. dan Rao, K.V.B. (2011). Screening of pectinase producing microorganisms from agricultural waste dump. *Asian Journal of Biochemical and Pharmaceutical Research* **1**: 329-337.
- Jayani, R.S., Saxena, S. dan Gupta, R. (2005). Microbial pectinolytic enzymes : a review. *Process Biochemistry* **40**: 2931-2944.
- Joshi, V.K., Parmar, M. dan Rana, N. (2011). Purification and characterization of pectinase produced from apple pomace and evaluation of its efficacy in fruit juice extraction and clarification. *Indian Journal of Natural Products and Resources* **2**(2): 189-197.
- Karam, N.E. dan Belarbi, A. (1995). Detection of polygalacturonase and pectinesterases in lactic acid bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **11**: 559-563.
- Karangwa, E., Rao, L.D.S., Nshimiyimana, M.B.K., Foh, L.L., Xia, S.Q. dan Zhang, X.M. (2010). Optimization of processing parameters for clarification of blended carrot-orange juice and improvement of its carotene content. *Journal of Food Science and Technology* **2**: 268-278.
- Kawano, C.Y., Chellegatti, M.A.S.C., Said, S. dan Fonseca, M.J.V. Comparative study of intracellular and extracellular pectinases produced by *Penicillium frequentans*. *Biotechnology and Applied Biochemistry* **29**: 133-140.
- Laurent, F., Kotoujansky, A. dan Bertheau, Y. (2000). Overproduction in *Escherichia coli* of the pectin methylesterase a from *Erwinia chrysanthemi* 3937: one-step purification, biochemical characterization, and production of polyclonal antibodies. *Canadian Journal of Microbiology* **46**: 474-480.
- Maldonado, M.C., Saad, A.M.S. dan Callieri, D.A.S. (1994). Purification and characterization of pectinesterase produced by a strain of *Aspergillus niger*. *Current Microbiology* **24**: 193-196.
- Maldonado, M.S. dan Saad, A.M.S. (1998). Production of pectinesterase and polygalacturonase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state systems. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **20**: 34-38.
- Maria, A, Vera, V., Montoya, J.A.S., Calva, G.C. dan Ramirez, E.G.R. (2007). Extraction, thermal stability, and kinetic behavior of pectinmethylesterase from hawthorn (*Crataegus pubescens*) fruit. *LWT-Food Science and Technology* **40**(2): 278-284.
- Minh, N.P. (2014). Enzymatic pectinase application in extraction and purification of juice turbidity from red rose apple pulp (*Syzygium malaccensis*). *International Journal of Multidisciplinary Research and Development* **1**(4): 45-51.

- Pitkanen, K., Heikinheimo, R. dan Pakkanen, R. (1992). Purification and characterization of *Erwinia chrysanthemi* B374 pectin methylesterase produced by *Bacillus subtilis*. *Enzyme and Microbial Technology* **14**: 832-836.
- Poedjiadi, A. (1994). *Dasar-Dasar Biokimia*. UI-PRESS, Jakarta.
- Rai, P., Majumdar, G.C., Jayanti, V.K., Dasgupta, S. dan De, S. (2006). Alternatif pretreatment methods to enzymatic treatment for clarification of mosambi juice using ultrafiltration. *Journal of Food Process Engineering* **9**: 202-218.
- Raj, A.A.S., Rubila, S., Jayabalan, R. dan Ranganathan, T.V. (2012). A review on pectin: chemistry due to general properties of pectin and its pharmaceutical uses. *Open Acces Scientific Reports* **1**(12): 1-4.
- Rijssel, M.V., Gerwig, G.J. dan Hansen, T.A. (1983). Isolation and characterization of an extracellular glycosylated protein complex from *Clostridium thermosaccharolyticum* with pectin methylesterase and polygalacturonatehydrolase activity. *Applied and Environmental Microbiology* **59**: 828-836.
- Sáenz, J.M., Téllez, A., Garza, H., Reyes, M., Contreras-Esquivel, J.C. dan Aguilar, C.N. (2000). Purification and some properties of pectinesterase from potato (*Solanum tuberosum* L.) alpha cultivar. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **43**(4): 393-398.
- Saranraj, P. dan Naidu, M.A. (2014). Microbial pectinases: a review. *Global Journal of Traditional Medicinal System* **3**(2): 1-9.
- Schell, M.A., Denny, T.P. dan Huang, J. (1994). Extracellular virulence factors of *Pseudomonas solanacearum*: role in disease and their regulation. *Dalam*: Kado, C.I. dan Crosa, J.H (ed.). *Mol Mech Bacterial Virulence*, hal. 311-24. Kluwer Academic Press, Netherlands.
- Schink, B. dan Zeikus, J. G. (1983). Characterization of pectinolytic enzymes of *Clostridium thermosulfurogenes*. *FEMS Microbiology Letters* **17**: 295-298.
- Semenova, M.V., Grishutin, S.G., Gusakov, A.V., Okunev, O.N. dan Sinitsyu, A.P. (2003). Isolation and properties of pectinases from the fungus *Aspergillus japonicus*. *Biochemistry* **68**: 559-569.
- Sharma, N.R., Sasankan, A., Singh, A. dan Soni, G. (2011). Production of polygalacturonase and pectin pethyl esterase from agrowaste by using isolates of *Aspergillus niger*. *Insight Microbiology* **1**(1): 1-7.
- Sharma, P.K. dan Chand, D. (2012). *Pseudomonas* sp. xylanase for clarification of mousambi and orange fruit juice. *International Journal of Advancements in Research and Technology* **1**: 1-3.
- Soelarso, B. (1996). *Budidaya Jeruk Bebas Penyakit*. Kanisius, Yogyakarta.
- Sudarmadji, S., Haryono, B. dan Suhardi. (2010). *Prosedur Analisis untuk Bahan Makanan dan Pertanian*. Liberty, Yogyakarta.
- Teixeira, M.F.S., Andrade, J.S., Fernandes, O.C.C., Duran, N. dan Filho, J.L. (2011). Quality attributes of cupuacu juice in response to treatment with crude enzyme extract produced by *Aspergillus japonicus* 586. *Enzyme Research* **2011**: 1-6.
- Truc, T.T., Nguyet, L.V.H. dan Muoi, N.V.(2011). Isolation and screening of *Aspergillus niger* strain for biosynthesis of pectin methylesterase from peel of some apple and fig (*Ficus racemosa*). *Journal of Food Science and Technology* **49**(1A): 453-458.
- Uçan, F., Akyildiz, A. dan ALçam. E. (2014). Effects of different enzymes and concentrations in the production of clarified lemon juice. *Journal of Food Processing* **2014**: 1-14.
- Widowati, E., Utami, R., Nurhartadi, E., Andriani, M.A.M. dan Wigati, A.W. (2014). Produksi dan karakterisasi enzim pektinase oleh bakteri pektinolitik dalam klarifikasi jus jeruk manis (*Citrus sinensis*). *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan* **3**(1): 16-20.
- Winarno, F.G. (1986). *Enzim Pangan*. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Yusak, Y. (2004). Pengaruh suhu dan pH *buffer* asetat terhadap hidrolisa CMC oleh enzim selulase dari ekstrak *Aspergillus niger* dalam media campuran onggok dan dedak. *Jurnal Sains Kimia* **8**: 35-37.
- Zamost, B., Nielsen, H.K. dan Starnes, R. (1991). Thermostable enzymes for industrial applications. *Journal of Industrial Microbiology* **8**: 71-81.